

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.**C12Q 1/26** (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)**(11) 공개번호** 10-2006-0020140**(43) 공개일자** 2006년03월06일

(21) 출원번호 10-2004-0068903
 (22) 출원일자 2004년08월31일

(71) 출원인
 에스케이 주식회사
 서울 종로구 서린동 99
 이화여자대학교 산학협력단
 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자
 강상원
 서울특별시 강남구 신사동 631-15
 박선주
 경상남도 김해시 진례면 산본리 1008
 조정우
 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 102-101
 김종웅
 대전광역시 서구 둔산2동 둔지아파트 107-601

(74) 대리인
 이한영

설명항목 : 양음

(54) 폐록시레독신의 활성검출 키트**요약**

효모에서 유래된 티오레독신 환원효소와 티오레독신을 포함하는 폐록시레독신(Prx)의 활성검출 키트 및 전기 검출키트를 이용하여, 폐록시레독신의 활성을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 폐록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트는 효모에서 유래된 티오레독신(yTrx), 효모에서 유래된 티오레독신 환원효소(yTrxR), NADPH, EDTA 및 반응완충용액과, H_2O_2 를 각각 개별적으로 포함한다. 본 발명의 폐록시레독신(Prx)의 활성검출 키트는 분리 정제가 용이하고 검출 감도가 높은 효모의 TrxR(yTrxR)를 포함하므로, 보다 경제적이고 효과적인 Prx의 활성측정에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대상

도 2b

색인어

폐록시레독신, 티오레독신, 티오레독신 환원효소, 효모, 암

명세서**도면의 간단한 설명**

도 1a는 티오레독신 농도에 따른 Prx I 폐록시다아제 활성 변화를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 티오레독신 환원효소의 농도에 따른 Prx I 폐록시다아제 활성 변화를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 hTrx1/rTrxR을 사용한 대조군에서 Prx의 활성을 측정한 그래프이다.

도 2b는 Prx 효소활성 검출키트를 사용하여 Prx의 활성을 측정한 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 폐록시레독신의 활성검출 키트에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 효모에서 유래된 티오레독신 환원효소와 티오레독신을 포함하는 폐록시레독신(Prx)의 활성검출 키트 및 전기 검출키트를 이용하여, 폐록시레독신의 활성을 검출하는 방법에 관한 것이다.

폐록시다아제(peroxidase)의 일종인 2-Cys 폐록시레독신(2-cys peroxiredoxin, Prx)은 포유류에서 세포 증식, 분화 및 세포사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다(참조: Wood et al., Trends Biochem. Sci., 28(1):32-40, 2003). 예를 들어, 2-Cys Prx I 및 III는 상호작용 단백질로서, 2-Cys Prx I는 myc-배가 신호전달에 관여하고, 2-Cys Prx III는 myc에 의한 전사조절의 표적이 되는 것으로 알려져 있다(참조: Mu et al., J. Biol. Chem., 277(45):43175-43184, 2002; Wonsey et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99(10):6649-6654, 2002). 또한, 2-Cys Prx II는 종양 피사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 및 세라마이드-유도 세포사멸에 관여하여, NF- κ B의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다(참조: Zhang et al., J. Biol. Chem., 272(49):30615-30627, 1997; Kang et al., J. Biol. Chem., 273(11):6297-6302, 1998).

한편, 효모에서 발견된 Prx는 단백질 및 혼산의 산화적 손상을 방지할 수 있기 때문에, 티올-특이 항산화제(thiol-specific antioxidant, TSA)라고 불리운다(참조: Kim et al., J. Biol. Chem., 263(10):4704-4711, 1988). 전기 효모에서 발견된 Prx는 새로운 타입의 폐록시다아제인 것으로 밝혀졌으며, 전기 효소가 활성화되기 위하여는 티오레독신(thioredoxin, Trx), 티오레독신 환원효소(thioredoxin reductase, TrxR) 및 NADPH가 필요하기 때문에, 티오레독신 폐록시다아제(thioredoxin peroxidase, TPx)라고도 알려지게 되었다(참조: Chae et al., J. Biol. Chem., 269(44):27670-8, 1994). 전기 TPx는 활성부 시스테인 잔기를 함유하는 아미노-말단 부위에서 아미노산 서열 상동성에 기초하여, 50개 이상의 동종형태(isoform)가 밝혀졌는데(참조: Wood et al., Trends Biochem. Sci., 28(1):32-40, 2003), 이러한 동종형태에는 포유류에서 발견되는 2-Cys Prx가 포함된다(참조: Rhee et al., IUBMB Life., 52(1-2):35-41, 2001).

특히, 포유류에서 발견되는 TPx는 암의 진행시 발현수준이 현저하게 증가됨이 보고되었는데, Prx I의 발현수준은 티로이드 종양조직 및 폐암조직에서 현저히 증가되었고(참조: Yanagawa et al., Cancer Lett. 1999 Oct 18;145(1-2):127-32. 1999; Chang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 289(2):507-512, 2001), 유방암 조직에서도 Prx I, II 및 III의 발현수준이 증가함이 보고되었다(참조: Noh et al., Anticancer Res., 21(3B):2085-90, 2001).

뿐만 아니라, TPx가 아닌 다른 종류의 Prx는 알츠하이머, 산화성 스트레스 등 각종 질환이 진행중인 환자의 조직에서 발현수준이 현저히 증가됨이 보고되어 있다(참조: Kinnula et al., J. Pathol., 196(3):316-23, 2002; Kim et al., J. Neural. Transm. Suppl., 61:223-35, 2001; Rabilloud et al., J. Biol. Chem., 277(22):19396-401, 2002; Wagner et al., Biochem. J., 366(Pt 3):777-85, 2002; Yang et al., J. Biol. Chem., 277(41):38029-36, 2002; Woo et al., J. Biol. Chem., 278(48):47361-4, 2003).

이에 따라, 각종 질환의 조기 진단방법의 하나로서, 세포 혹은 조직에서 Prx의 활성을 측정하는 방법이 제안되고 있는 실정이나, 실체적으로는 적용되지 못하고 있는 실정이다. 즉, Prx의 활성을 측정하기 위하여, NADPH의 존재하에서 Trx와 TrxR의 결합정도를 측정하는 방법이 사용되고 있으며, 이때 사용되는 TrxR은 래트 또는 사람의 태반에서 수득하지만, 실질적으로 TrxR은 래트 또는 사람의 태반에 극히 미량이 존재하며, TrxR의 정제과정도 복잡하기 때문에, TrxR의 수급이 어렵다는 단점이 있다(참조: Arner et al., Methods Enzymol., 300:226-39, 1999). 만일, TPx의 활성을 효과적으로 측정할 수 있는 방법이 개발될 경우, 보다 효과적으로 질환의 조기진단이 수행될 수 있을 것으로 기대되고 있어, 활발한 연구가 진행되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

따라서, 경제적으로 시료내의 Prx 효소활성을 측정할 수 있는 새로운 방법을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 경제적으로 시료내의 Prx 효소활성을 측정할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 효모에서 유래된 티오레독신(yTrx)과 티오레독신 환원효소(yTrxR)를 포함하는 키트를 이용할 경우, Prx 효소활성을 보다 경제적이고, 효율적으로 측정할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 효모의 티오레독신과 티오레독신 환원효소를 포함하는 Prx 효소활성 검출키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 검출키트를 이용하여, 시료에 함유된 Prx의 효소활성을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 검출키트를 이용하여, 폐록시레독신의 활성 억제제 혹은 촉진제를 탐색하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 폐록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트는 효모에서 유래된 티오레독신(yTrx), 효모에서 유래된 티오레독신 환원효소(yTrxR), NADPH, EDTA 및 반응완충용액과, H_2O_2 를 각각 개별적으로 포함한다.: 이때, 반응완충용액은 특별히 이에 제한되지 않으나, pH 6.0 내지 8.0에서 완충효과를 나타내는 HEPES-NaOH 완충용액을 사용함이 바람직하고, 반응의 안정성을 향상시키기 위하여, 글리세롤을 추가로 포함할 수도 있다.

지금까지 알려진 바에 의하면, 인간의 세포 또는 조직에 존재하는 폐록시레독신(Prx)의 효소활성을 측정하기 위하여, 사용되는 Trx 및 TrxR은 사람에게서 유래된 것과 사람이 아닌 다른 포유동물에서 유래된 것에 차이가 있다고 알려져 있으며, 랫트의 것이 사람의 것과 비교적 가장 유사한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 다른 포유동물로부터 유래된 것은 사람의 것과 크게 상이하다고 알려져 있다. 일반적으로, TrxR을 다량으로 포함하는 조직은 태반조직으로 알려져 있기 때문에, 태반조직으로부터 TrxR을 추출하여 사용하지만, 랫트 또는 사람의 조직으로부터 TrxR을 수득할 경우, 태반시료의 수급이 어렵고, 수율이 낮기 때문에, TrxR을 다량으로 사용하는 Prx의 활성을 측정방법이 용이하게 사용될 수 없었다.

본 발명자들은 사람 또는 랫트의 태반으로부터 수득되는 TrxR을 대체할 수 있는 TrxR을 다양한 동물로부터 검색한 결과, 포유동물 뿐만 아니라 파충류, 양서류 및 어류 등의 동물로부터 수득한 TrxR은 사용할 수 없음을 확인하였다. 이는 동물의 TrxR이 보존서열(-Gly-Cys-SeCys-Gly-COOH)을 포함하는 C-말단 연장부를 가지기 때문인데, 전기 보존서열은 TrxR로 하여금 티오레독신 이외에 리포산, NK-리신, 앤셀린(ebselen) 등의 다양한 기질에 대하여 기질 특이성을 나타내게 한다. 뿐만 아니라, 포유동물의 TrxR은 하이드로페록시 환원효소의 활성을 나타내기 때문에, 정확한 Prx의 활성측정에 걸림돌이 되고 있다.

이에, 본 발명자들은 검색범위를 동물수준이 아니라, 진핵생물의 수준으로 확장하여, 검색한 결과, 효모의 일종인 사카로마이세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae)로부터 유래된 TrxR(yTrxR)은 동물에서 유래된 TrxR에 존재하는 보존서열이 없기 때문에, Prx에 대한 기질 특이성만을 나타내고, 하이드로페록시 환원효소의 활성을 나타내지 않기 때문에, 사람 또는 랫트의 태반으로부터 수득되는 TrxR을 사용할 때보다, Prx의 활성을 정확히 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

뿐만 아니라, 전기 사카로마이세스 세레비지아에로부터 수득한 Trx 및 TrxR 유전자를 이용하여 생산된 재조합 단백질이 사카로마이세스 세레비지아에로부터 수득한 것과 유사한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다

이에, 본 발명자들은 시료에 존재하는 Prx의 활성을 보다 용이하게 측정하기 위하여, 효모에서 유래된 Trx 및 TrxR를 포함하는 키트를 제조하였다. 전기 키트에는 효모에서 유래된 Trx(yTrx)와 TrxR(yTrxR) 뿐만 아니라, Prx의 반응을 위한 NADPH 및 EDTA를 포함하고, 이들의 반응완충용액인 HEPES-NaOH 완충용액(pH 6.0-8.0)과 반응산물을 검출하기 위

한 H_2O_2 를 포함한다: 이때, 보다 용이하게 사용할 수 있도록, yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 HEPES-NaOH 완충용액을 혼합한 혼합액의 형태로 키트에 포함함이 바람직하고, 반응의 안정성을 향상시키기 위하여, 전기 혼합액에 글리세롤을 추가로 포함할 수도 있다.

전기 키트를 이용하여, Prx의 활성을 검출하는 방법은 폐록시레독신(Prx)이 함유되어 있는 것으로 추정되는 시료를 전기 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; 전기 반응물과 전기 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 실험군을 준비하는 단계; 중류수를 전기 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; 전기 반응물과 전기 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 대조군을 준비하는 단계; 및, 전기 준비된 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계를 포함한다: 이때, 흡광도는 340nm에서 측정함이 바람직하다. 통상적으로 대조군의 경우, 340nm에서 약 1.2 정도의 흡광도를 나타내며, Prx가 존재할 경우, 흡광도값이 감소되므로, 실험군의 흡광도가 대조군에 비하여 감소될 경우 Prx의 활성이 나타난다고 간주될 수 있다.

아울러, 전기 키트를 이용하여 Prx의 활성을 측정하는 방법은 시료내에 미리 결정된 양의 정제된 폐록시레독신을 추가적으로 첨가하여 폐록시레독신의 활성 억제제 혹은 촉진제를 탐색하는데에도 이용될 수도 있다.

즉, 폐록시레독신의 활성 억제제 혹은 촉진제를 탐색하는 방법은, 폐록시레독신의 활성 억제제 또는 촉진제가 함유되어 있는 것으로 추정되는 시료와 폐록시레독신(Prx)을 전기 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; 전기 반응물과 전기 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 실험군을 준비하는 단계; 폐록시레독신(Prx)을 전기 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; 전기 반응물과 전기 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 대조군을 준비하는 단계; 및, 전기 준비된 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계를 포함한다.

이러한 경우, 대조군에는 미리 결정된 양의 정제된 폐록시레독신이 함유되어 있어 예측 흡광도를 미리 알 수 있으므로, 시험군으로부터 얻어진 흡광도가 예측 흡광도와 동일한 수준일 경우에는 폐록시레독신의 활성 억제제나 촉진제가 존재하지 않음을 나타내며, 만일 시료로부터 예측 흡광도보다 낮은 흡광도가 얻어질 경우에는 폐록시레독신의 활성 촉진제가 존재함을 나타내며 만일 시료로부터 예측 흡광도보다 높은 흡광도가 얻어질 경우에는 폐록시레독신의 활성 억제제가 존재함을 나타낸다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 발현벡터의 작제

인간에서 유래된 Trx1, 효모에서 유래된 Trx1 및 효모에서 유래된 yTrxR을 대장균에서 발현시킬 수 있는 발현벡터를 작제하였다.

실시예 1-1: 인간 Trx1(hTrx1) 발현벡터의 작제

인간 Trx1(hTrx1) cDNA의 전장 클론을 얻기 위해, 인간 간 cDNA 라이브러리를 주형으로 하고, 센스 프라이머 5'-atcatatggtaagcagatc-3'(서열번호 3) 및 앤티센스 프라이머 5'-ccggaattcttagactaattcattaatgc-3'(서열번호 4)를 이용한 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 수행하여, 약 320bp 크기의 PCR 산물을 수득하였으며, 이를 클로닝 벡터 pCR2(Invitrogen, USA)내에 삽입하여 pCR-hTrx1을 작제하였다. 전기 pCR-hTrx1를 제한효소 Nde I 및 EcoR I으로 절단하여 수득한 약 320bp의 Nde I-EcoR I 제한절편을 후속적으로 대장균 발현벡터 pET17b(Novagen, USA)내에 서브클로닝하여, pET17b-hTrx1을 작제하였다.

실시예 1-2: 효모 Trx1(yTrx1) 발현벡터의 작제

효모의 Trx1(yTrx1) cDNA를 클로닝하기 위하여, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 게노믹 DNA(Clontech, USA)를 PCR용 주형으로 사용하고, 센스프라이머 5'-atcatatggttactcaattcaaaaactgc-3'(서열번호 5) 및 앤티센스 프라이머 5'-aacttagttaaggcattagcagcaatggcttc-3'(서열번호 6)를 이용한 PCR을 수행하여, 수득한 약 320bp 크기의 yTrx1 PCR 산물

을 pCR2 벡터에 클로닝하여 pCR-yTrx1를 작제하고, 제한효소 Nde I 및 Spe I로 절단하여 약 320bp 크기의 Nde I-Spe I 절편을 수득하였다. 이어, 전기 절편을 pET17b에 서브클로닝하여, 재조합 벡터 pET17b-yTrx1를 작제하였다. 이때, 전기 재조합 벡터 pET17b-yTrx1는 효모(*accharomyces cerevisiae*)의 12번 염색체상에 존재하는 Trx1 유전자(서열번호 1)를 포함한다.

실시예 1-3: 효모 TrxR(yTrxR) 발현벡터의 작제

효모의 yTrxR cDNA를 클로닝하기 위하여, 효모 게노믹 DNA를 PCR용 주형으로 사용하고, 센스프라이머 5'-
atcatatggttcacaacaaagtactatc-3'(서열번호 7) 및 앤터센스 프라이머 5'-tactatgtctattctaggaaagttaagtatttc-3'(서열번호 8)를 이용한 PCR을 수행하여, 수득한 약 960bp 크기의 yTrxR PCR 산물을 pCR2 벡터에 클로닝하여 pCR-yTrxR를 작제하고, 제한효소 Nde I 및 Spe I로 절단하여 약 960bp 크기의 Nde I-Spe I 절편을 수득하였다. 이어, 전기 절편을 pET17b에 서브클로닝하여, 재조합 벡터 pET17b-yTrxR를 작제하였다. 이때, 전기 재조합 벡터 pET17b-yTrxR는 효모의 4번 염색체상에 존재하는 TrxR 유전자(서열번호 2)를 포함한다.

실시예 2: 재조합 단백질의 제조

전기 실시예 1-1 내지 1-3에서 작제한 각각의 발현벡터를 이용하여 대장균을 형질전환시키고, 이로부터 각각의 재조합 단백질을 제조하였다.

실시예 2-1: hTrx1의 발현 및 정제

전기 실시예 1-1에서 작제한 pET17b-hTrx1을 이용하여 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환시킨 다음, LB(Luria-bertani) 배양액에서 10L 발효기(Han II Instrument Co., 대한민국)로 배양하였으며, 배양된 전기 형질전환체에 1mM IPTG를 3시간동안 처리하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 전기 IPTG 유도된 세포 배양액을 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 수득하였으며, 10배 부피의 추출완충용액(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM AEBSF 및 5mM DTT)에 재부유시킨 다음, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 전기 분쇄액을 12,000×g에서 30분간 원심분리한 다음, 상층액을 즉시 열음상에서 30분동안 방치하고, 스트렙토마이신 세파이트(1% 최종 농도)로 처리한 다음, 12,000×g에서 30분동안 4°C에서 원심분리하여 혼산을 침전시킨 후, 최종 상층액을 수득하였다. 전기 수득한 상층액을 전기영동한 결과, 재조합 단백질인 hTrx1이 대장균에서 가용성 단백질로 발현됨을 확인할 수 있었다.

전기 상층액을 75°C에서 30분동안 열처리하고, 원심분리하여 변성 단백질을 제거한 다음, DEAE-세파로즈 컬럼(2.5×11cm)상에 적용하고, 레진을 버퍼 A(20mM Tris-HCl, pH 7.5 및 1mM EDTA) 200ml로 세척하였다. 이어, 0 내지 500mM의 NaCl을 포함하는 버퍼 A를 이용하여, 농도구배로 용출시켜서 활성분획을 수득한 다음, 농축시키고, 150mM NaCl을 포함하는 버퍼 A로 예비-평형된 세파크릴(Sephadryl) S-100 겔 투과(gel filtration) 컬럼에 적용하여, 순수 hTrx1 단백질을 함유하는 분획을 수득하였다.

실시예 2-2: yTrx1의 발현 및 정제

전기 실시예 1-2에서 작제한 pET17b-yTrx1을 이용하여 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환시킨 다음, LB 배양액에서 10L 발효기로 배양하였으며, 배양된 전기 형질전환체에 1mM IPTG를 3시간동안 처리하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 전기 IPTG 유도된 세포 배양액을 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 수득하였으며, 10배 부피의 추출완충용액에 재부유시킨 다음, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 전기 분쇄액을 12,000×g에서 30분간 원심분리한 다음, 상층액을 즉시 열음상에서 30분동안 방치하고, 스트렙토마이신 세파이트(1% 최종 농도)로 처리한 다음, 12,000×g에서 30분동안 4°C에서 원심분리하여 혼산을 침전시킨 후, 최종 상층액을 수득하였다. 전기 수득한 상층액을 전기영동한 결과, 재조합 단백질인 yTrx1이 대장균에서 가용성 단백질로 발현됨을 확인할 수 있었다

전기 상층액을 75°C에서 30분동안 열처리하고, 원심분리하여 변성 단백질을 제거한 다음, DEAE-세파로즈 컬럼(2.5×11cm)상에 적용하고, 레진을 버퍼 A 200ml로 세척하였다. 이어, 0 내지 500mM의 NaCl을 포함하는 버퍼 A를 이용하여, 농도구배로 용출시켜서 활성분획을 수득한 다음, 농축시키고, 150mM NaCl을 포함하는 버퍼 A로 예비-평형된 세파크릴(Sephadryl) S-100 겔 투과 컬럼에 적용하여, 순수 yTrx1 단백질을 함유하는 분획을 수득하였다.

실시예 2-3: yTrxR의 발현 및 정제

전기 실시예 1-3에서 작제한 pET17b-yTrxR을 이용하여 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환시킨 다음, LB 배양액에서 10L 발효기로 배양하였으며, 배양된 전기 형질전환체에 1mM IPTG를 3시간동안 처리하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 전기 IPTG 유도된 세포 배양액을 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 수득하였으며, 10배 부피의 추출완충용액에 재부유시킨 다음, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 전기 분쇄액을 12,000×g에서 30분간 원심분리한 다음, 상층액을 즉시 얼음상에서 30분동안 방치하고, 스트렙토마이신 설페이트(1% 최종 농도)로 처리한 다음, 12,000×g에서 30분동안 4°C에서 원심분리하여 핵산을 침전시킨 후, 최종 상층액을 수득하였다. 전기 수득한 상층액을 전기영동한 결과, 재조합 단백질인 yTrxR이 대장균에서 가용성 단백질로 발현됨을 확인할 수 있었다.

전기 상층액을 DEAE 음이온 교환기 및 페닐 소수성 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 즉, 전기 상층액을 DEAE-세파로즈 컬럼(2.5 x 11cm)상에 적용하고, 레진을 버퍼 A 200ml로 세척한 다음, 0 내지 500mM NaCl이 함유된 버퍼 A 50ml을 이용한 농도구배로 용출시켜서, 활성분획(200mM NaCl 분획)을 수득하였다. 전기 수득한 활성분획을 농축한 다음, 버퍼 B(20mM HEPES-NaOH, pH 7.0 및 1mM EDTA)에 대하여 투석하고, 전기 yTrxR 단백질을 1M 암모늄 설페이트(pH 7.0)로 평형시킨 다음, TSK™ 페닐-5PW HPLC 컬럼(21.5mm x 15cm, Tosoh Corporation, Japan)상에 적용하였으며, 1 내지 0M 암모늄 설페이트를 포함하는 버퍼 B를 이용하여, 60분동안 5ml/분의 유속으로 용출시켜서, 재조합 yTrxR 단백질을 수득하였다. 전기 단백질의 수율은 배양액 1L당 약 40mg이었다.

실시예 3: Prx의 수득

PBS(phosphate buffered saline)로 침지된 래트 폐 0.7g을 20ml의 20mM HEPES-NaOH 완충용액(1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM AEBSF, 웨스타틴 1 μ g/ml, 루펩틴5 μ g/ml, 아프로티닌 5 μ g/ml, pH 7.0)에서 균질화시켰다. 전기 균질현탁액을 15,000×g에서 4°C에서 30분동안 원심분리하여, 상층액을 수득하고, 1.5ml 용량의 원심분리용 튜브에서 버퍼 B로 예비-평형된 DEAE-Sepharose(200 μ l 레진 체적)와 혼합하였다. 전기 레진을 1ml의 버퍼 B로 2회 세척하고, 100 내지 500mM NaCl이 함유된 버퍼 B를 이용하여, 단계구배로 용출하여, 활성분획을 수득하고, Prx I에 대한 항체를 이용한 면역불특방법을 이용하여, Prx I을 수득하였다.

실시예 4: Prx 활성 분석

전기 실시예 2-1 내지 2-3에서 각각 제조한 hTrx1, yTrx1 및 yTrxR을 이용하여, 전기 실시예 3에서 제조한 Prx I의 활성을 측정할 수 있는지 확인하였다.

실시예 5-1: yTrx1의 농도변화에 따른 yTrxR과 Prx I의 결합반응

1mM EDTA를 함유하는 50mM HEPES-NaOH 버퍼(pH 7.0)내에 200 μ M NADPH, 0, 0.5, 1.0 및 1.5 μ M yTrx1, 400nM rTrxR 및 Prx I 10 μ g을 먼저 반응시키고, 이어 H₂O₂ 100 μ M를 첨가하고, 30°C에서 3분동안 Agilent UV8453 분광광도계(Hewlett Packard, USA)에서 340nm에서 흡광도의 감소에 따라 모니터링하여, NADPH의 산화정도를 측정하였다(참조: 도 1a). 이때, 대조군으로는 yTrx1 대신에 hTrx1을 사용한 실험군을 사용하였다. 도 1a는 티오레독신 농도에 따른 Prx I 폐록시다아제 활성 변화를 나타내는 그래프로서, (+)yTrx의 곡선은 yTrx1을 이용한 실험군이고, (+)hTrx의 곡선은 대조군을 나타낸다. 도 1a에서 보듯이, Prx I과 증가된 농도의 yTrx1의 활성은 전형적인 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 곡선을 나타내었는데, yTrx1에 대한 Km 값은 1.0 μ M으로 측정되었고, Vmax는 hPrx I 1mg 당 2.8 μ mole/분이 되는 것으로 측정되었다. 반면, Prx I과 증가된 농도의 hTrx1의 활성은 별다른 효과를 나타내지 못하는 것으로 분석되었는 바, yTrx가 yTrxR에 대한 적절한 기질임을 확인할 수 있었다.

실시예 5-2: yTrxR의 농도변화에 따른 yTrxR과 Prx I의 결합반응

1mM EDTA를 함유하는 50mM HEPES-NaOH 버퍼(pH 7.0)내에 200 μ M NADPH, 2.5 μ M yTrx1, 0, 10, 50, 60, 100, 150, 200, 400 및 500nM yTrxR 및 Prx I 10 μ g을 먼저 반응시키고, 이어 H₂O₂ 100 μ M를 첨가하고, 30°C에서 3분동안 Agilent UV8453 분광광도계에서 340nm에서 흡광도의 감소에 따라 모니터링하여, NADPH의 산화정도를 측정하였다(참조: 도 1b). 이때, 대조군으로는 yTrxR 대신에 래트의 테반에서 수득한 0, 10, 20, 50, 70, 90 및 100nM의 rTrxR를 사용한 실험군을 사용하였다. 도 1b는 티오레독신 환원효소의 농도에 따른 Prx I 폐록시다아제 활성 변화를 나타내는 그래프로서, (+)효모 TR의 곡선은 yTrxR을 이용한 실험군이고, (+) 래트 TR의 곡선은 대조군을 나타낸다. 도 1b에서 보듯이, 비록 Prx I의 활성을 지지하는데 필요한 yTrxR의 농도가 rTrxR보다 약 5배 높지만, 효모 TrxR 및 Trx를 이용할 경우에도, Prx 활성을 측정할 수 있음을 확인하였다.

실시예 6: Prx 효소활성 검출키트의 제작 및 전기 키트를 이용한 Prx의 활성측정

전기 실시예 5-1 및 5-2의 결과로부터, 효모에서 유래된 TrxR 및 Trx를 이용할 경우에도, Prx 활성을 측정할 수 있음을 확인하였는 바, 효모에서 유래된 TrxR 및 Trx를 포함하는 Prx 효소활성 검출키트를 제작하고, 이를 이용하여 Prx의 활성을 측정하였다.

실시예 6-1: Prx 효소활성 검출키트의 제작

200 μ M NADPH, 2.5 μ M yTrx1, 400nM yTrxR 및 1mM EDTA를 함유하는 50mM HEPES-NaOH 버퍼(pH 7.0) 50 μ l을 마이크로 투브에 넣어 A 파트와 H₂O₂ 100 μ M를 마이크로 투브에 넣어 B 파트를 각각 준비하여, Prx 효소활성 검출키트를 제작하였다.

실시예 6-2: Prx 효소활성 검출키트를 이용한 Prx의 활성측정

전기 실시예 6-1에서 제작한 Prx 효소활성 검출키트의 A 파트에 인간에서 유래된 2-Cys Prx인 hPrx I, hPrx II, hPrx III, hPrx IV 및 hPrx V를 각각 4.7 μ M씩 넣고 혼합한 다음, B 파트를 첨가하고, 30°C에서 3분동안 Agilent UV8453 분광광도계에서 340nm에서 흡광도의 감소에 따라 모니터링하여, NADPH의 산화정도를 측정하였다. 또한, 대조군으로서, yTrx1 대신에 hTrx1을 사용하고, yTrxR 대신에 rTrxR를 사용한 실험군을 사용하였다(참조: 도 2a, 도 2b). 도 2a는 hTrx1/rTrxR을 사용한 대조군에서 Prx의 활성을 측정한 그레프이고, 도 2b는 Prx 효소활성 검출키트를 사용하여 Prx의 활성을 측정한 그레프이다. 도 2a 및 도 2b에서 보듯이, 본 발명의 Prx 효소활성 검출키트는 다양한 Prx 동종형태(isoform) 효소의 활성을 측정할 수 있었고, 포유동물에서 유래된 hTrx1/rTrxR 보다 높은 수준으로 Prx 효소의 활성을 측정할 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 효모에서 유래된 티오레독신 환원효소와 티오레독신을 포함하는 페록시레독신(Prx)의 활성검출 키트 및 전기 검출키트를 이용하여, 페록시레독신의 활성을 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명의 페록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트는 효모에서 유래된 티오레독신(yTrx), 효모에서 유래된 티오레독신 환원효소(yTrxR), NADPH, EDTA 및 반응완충용액과, H₂O₂를 각각 개별적으로 포함한다. 본 발명의 페록시레독신(Prx)의 활성 검출 키트는 분리 정제가 용이하고 검출 감도가 높은 효모의 TrxR(yTrxR)를 포함하므로, 보다 경제적이고 효과적인 Prx의 활성측정에 널리 활용될 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

효모에서 유래된 티오레독신(yTrx), 효모에서 유래된 티오레독신 환원효소(yTrxR), NADPH, EDTA 및 반응완충용액과, H₂O₂를 각각 개별적으로 포함하는, 페록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

반응완충용액은 HEPES-NaOH 완충용액(pH 6.0 내지 8.0)인 것을 특징으로 하는

페록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

글리세롤을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는

페록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트.

청구항 4.

(i) 페록시레독신(Prx)이 함유되어 있는 것으로 추정되는 시료를 제 1항의 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계;

(ii) 전기 반응물과 제 1항의 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 실험군을 준비하는 단계;

(iii) 증류수를 제 1항의 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계;

(iv) 전기 반응물과 제 1항의 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 대조군을 준비하는 단계;

(v) 전기 (ii) 단계에서 준비된 실험군과 (iv) 단계에서 준비된 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계를 포함하는, 페록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트를 이용하여 Prx의 활성을 검출하는 방법.

청구항 5.

제 4항에 있어서,

흡광도는 340nm에서 측정하는 것을 특징으로 하는

페록시레독신(Prx)의 효소활성 검출키트를 이용하여 Prx의 활성을 검출하는 방법.

청구항 6.

(i) 페록시레독신의 활성 억제제 또는 촉진제가 함유되어 있는 것으로 추정되는 시료와 페록시레독신(Prx)을 전기 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계;

(ii) 전기 반응물과 전기 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 실험군을 준비하는 단계;

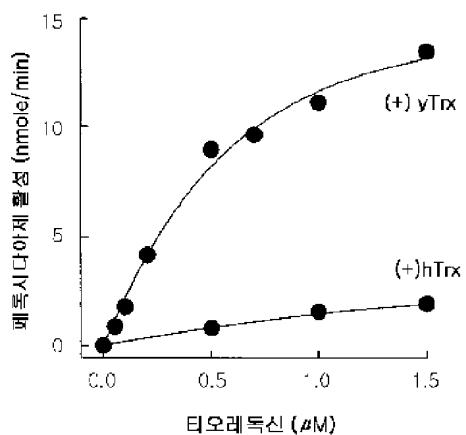
(iii) 페록시레독신(Prx)을 전기 키트에 포함된 yTrx, yTrxR, NADPH, EDTA 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계;

(iv) 전기 반응물과 전기 키트에 포함된 H_2O_2 를 혼합하여 산화반응을 수행하여 대조군을 준비하는 단계; 및,

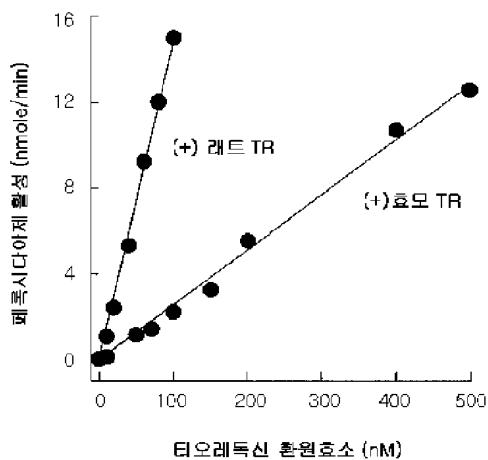
(v) 전기 준비된 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계를 포함하는, 페록시레독신의 활성 억제제 혹은 촉진제를 탐색하는 방법.

보류

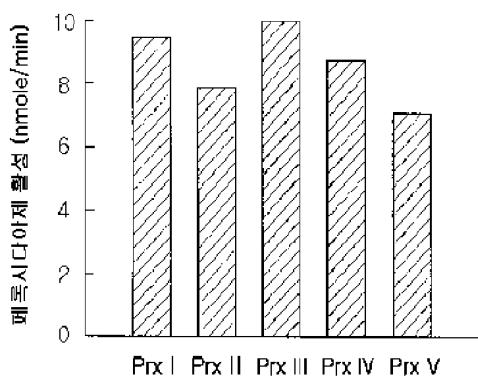
도면1a



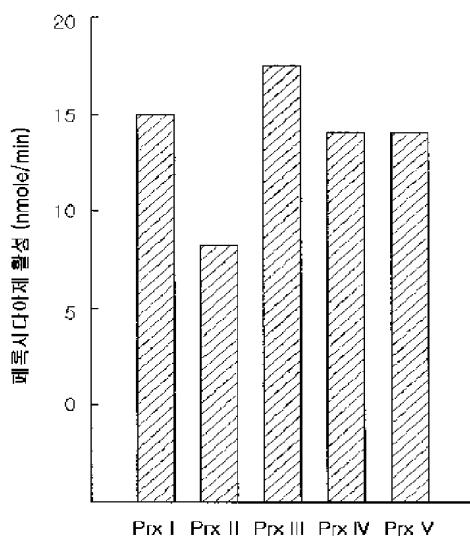
도면1b



도면2a



표면2b



서명목록

<110> SK CORPORATION
Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Kit for Detecting the Activity of Peroxiredoxin

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 312
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1
atggttactc aattcaaaaac tgccagcgaa ttgcactctg caattgctca agacaagcta 60
gttgcgttag atttctacgc cactgggtgc ggtccatgta aatgattgc tccaatgatt 120
gaaaaattct ctgaacaata cccacaagct gatttctata aattggatgt cgatgaattg 180
ggtgatgttg cacaaaagaa tgaagttcc gctatgccaa ctttgcatttct attcaagaac 240
ggtaaggaag ttgcaaagggt tgggtgcc aaccagcgg ctattaagca agccattgct 300
gctaatgctt aa 312

<210> 2
<211> 960
<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2	
atggttcaca acaaagttac tattcatttgt tcaggtccag ctgcacacac cgccgcccac	60
tatttggcca gggcagaaat caagccaaatc cttatataaag gtatgtatggc gaaacggatt	120
gctgccggtg gccagctaac caccactaca gaaatcgaaa acttcccagg tttcccagat	180
ggtctaacatc gtagcgaact gatggacaga atgagagaac aatccacgaa gtttggcact	240
gaaattatca cgaaacagt ttccaaagtt gatctgtt ccaaaccatt caagctatgg	300
accgaattta acgaagacgc agaacctgtg acgactgacg ctataatctt ggccacaggc	360
gcttctgcta agagaatgca tttgcccggc gaggaaacct actggcaaaa aggtatttct	420
gcctgtgccg tgtgtgtatgg tgccgtcccc atttcagaa acaagccatt ggccgtcatt	480
ggtgggtggtg actctgcatt tgaagaagct cagttcttga ccaagtaacgg ctcaaaagt	540
tttatgtttt tcagaaaaga ccatttgcgt gcttctacca ttatgcaaaa gcgtgctgag	600
aagaacgaaa aaattgaaat cctttacaac actgttgcgc tagaagctaa gggggatgg	660
aaattattga atgccttgag gattaagaac actaaaaaga atgaagaaac cgatttgcca	720
gtcagcggtt tattttatgc aattggccac actccagcaa caaagattgt cgctggccaa	780
gtcgacactg atgaagcggg ctacattaaa actgtcccaag gcagtcatt aacctccgtt	840
ccaggatttt tcgctgctgg ttagtggat gattctaaat acagacaagc tattacttct	900
gctggctctg gttgtatggc cgctttggat gctgagaaat acttaacttc cctagaataag	960
	960

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

atcatatggt gaagcagatc	20
-----------------------	----

<210> 4

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
 ccggaattct tagactaatt cattaatg 28

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 5
 atccatatgg tactcaattc aaaactgc 28

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6
 aactagttaa gcattagcag caatggcttg c 31

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 atccatatgg tcacaacaaa gttactatc 29

<210> 8

<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
tactagtcta ttcttagggaa gttaagtatt tc 32